

# 利用 *Tri8* 基因区分中国小麦赤霉病菌的毒素化学型

刘杨杨<sup>1,2</sup>, 孙海燕<sup>2</sup>, 李伟<sup>2</sup>, 邓渊钰<sup>2</sup>, 张爱香<sup>2</sup>, 陈怀谷<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; <sup>2</sup>江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014)

**摘要:**由镰孢菌(*Fusarium* spp.)引起的小麦赤霉病在全世界均有发生,我国小麦赤霉病主要由禾谷镰孢菌复合种(*Fusarium graminearum* species complex, FGSC)所引起,根据产生单族毒素种类分为三种化学型,分别为3-乙酰脱氧雪腐镰孢菌烯醇(3-AcDON)、15-乙酰脱氧雪腐镰孢菌烯醇(15-AcDON)和雪腐镰孢菌烯醇(NIV)化学型。为了方便地对禾谷镰孢菌复合种进行化学型的区分,本研究利用三对引物分别扩增了三种化学型菌株的*Tri8*基因并进行了序列测定,根据不同化学型菌株的基因序列差异,进行了特异性引物设计和筛选。利用设计的引物同时扩增三种化学型的*Tri8*基因并用*AvaI*内切酶进行酶切,根据酶切片段的大小区分三种化学型。研究表明该方法可准确有效地区分我国小麦赤霉病菌的化学型。

**关键词:**小麦赤霉病;禾谷镰孢菌;*Tri8*基因;化学型

**Identification of three chemotypes of *Fusarium graminearum* species complex in China by *Tri8* gene** LIU Yang-yang<sup>1,2</sup>, SUN Hai-yan<sup>2</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, DENG Yuan-yu<sup>2</sup>, ZHANG Ai-xiang<sup>2</sup>, CHEN Huai-gu<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Plant Protection, Nanjing Agricultural University; Nanjing 210095, China; <sup>2</sup>Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** *Fusarium* head blight caused by *Fusarium* spp. occurs worldwide on small grain cereals. In China, *Fusarium* head blight is mainly caused by *Fusarium graminearum* species complex (FGSC). FGSC produces trichothecene toxins and it was divided into 3 chemotypes: nivalenol (NIV), 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON) and 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON). In order to distinguish these three chemotypes, *Tri8* gene of three chemotype isolates was amplified by using three pairs of primers and sequenced. According to the difference of *Tri8* gene sequences of three chemotypes, specific primers were designed and screened. We found that 3 chemotypes can be differentiated according to the size of fragments after *Tri8* gene was digested with *AvaI* enzyme. The procedure developed in this study could be used to identify the chemotype of the major pathogen of *Fusarium* head blight in China.

**Key words:** *Fusarium* head blight; *Fusarium graminearum* species complex; *Tri8*; chemotype

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)01-0001-07

由禾谷镰孢菌复合种引起的赤霉病在世界普遍发生。赤霉病除了造成产量降低外,病菌产生的单端孢霉烯族毒素(Trichothecene, 简称单族毒素)还会威胁人畜健康<sup>[1-4]</sup>。2010年以前,我国小麦赤

霉病主要发生于长江中下游麦区,近年来在黄淮等麦区该病的发生加重。赤霉病已经成为影响小麦稳产高产的重要因素之一<sup>[5]</sup>。

我国小麦赤霉病主要是由禾谷镰孢菌复合种

收稿日期: 2017-05-16; 修回日期: 2017-06-08; 网络出版时间: 2017-06-08

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20170608.1549.001.html>

基金项目: 国家公益性行业(农业)项目(201303016); 国家小麦产业技术体系(CARS-3-1-17); 江苏省农业科技自主创新项目(BE2013432)

通讯作者: 陈怀谷, 研究员, 主要从事植物病害控制研究; E-mail: huaigu@jaas.ac.cn

第一作者: 刘杨杨, 女, 山东济宁人, 硕士, 主要从事小麦真菌病害控制研究; E-mail: llyy050@126.com。

引起的,主要为 *Fusarium graminearum* 和 *F. asiaticum* 两个种<sup>[6]</sup>。按照所产毒素化学结构的不同分为三种化学型:产脱氧雪腐镰孢菌烯醇(DON)和3-乙酰脱氧雪腐镰孢菌烯醇(3-AcDON)的3-AcDON型、产脱氧雪腐镰孢菌烯醇(DON)和15-乙酰脱氧雪腐镰孢菌烯醇(15-AcDON)的15-AcDON型以及产雪腐镰孢菌烯醇(NIV)的NIV型<sup>[7]</sup>。

对单端孢霉烯族毒素化学型鉴定最直接、最准确的方法是化学测定法,如气相色谱法、液相色谱法、气相质谱联用等,但是使用这些方法的前处理太过复杂且成本较高,现在采用更多的是基于相关基因的差异进行化学型区分<sup>[8]</sup>。Ward等<sup>[9]</sup>根据毒素合成相关基因 *Tri3* 和 *Tri12* 设计了两套复合引物,可以在一个PCR反应体系中区分三种菌株毒素化学型。Li等<sup>[10]</sup>通过比较 *Tri5* 基因和 *Tri6* 基因之间的保守序列设计了特异性引物TOXP,用来鉴定DON化学型菌株和NIV化学型菌株,DON型菌株可以扩增出300 bp左右的片段,NIV型菌株扩增出的片段大小为360 bp。Suzuki等<sup>[11]</sup>根据 *Tri6* 基因序列和 *Tri3* 基因序列,利用多重PCR,分别设计了三对引物和一对引物用来区分禾谷镰孢菌的种和化学型。Jennings等<sup>[12, 13]</sup>根据 *Tri3* 基因设计了引物 Tri303F/R、Tri315F/R 和 Tri3NIVF/R,分别在3-AcDON、15-AcDON和NIV毒素化学型菌株中扩增出586、864和549 bp大小的片段,从而将三种毒素化学型分开。

禾谷镰孢菌产毒素的种类与其单端孢霉烯族毒素的合成途径有关。单端孢霉烯族毒素的生物合成过程中的合成酶和调控蛋白是由15个基因编码的,这15个基因位于不同染色体上的3个不同的位置,其中12个基因形成一个 *Tri* 基因簇<sup>[14-16]</sup>。*Tri8* 基因编码一个具有脱乙酰化作用的酯酶,它可以催化3,15-乙酰基脱氧雪腐镰孢菌烯醇不同位点的C位脱乙酰化。在产生3-AcDON毒素的菌株中,催化3,15-乙酰基脱氧雪腐镰孢菌烯醇的C15位脱乙酰化而形成3-乙酰基脱氧雪腐镰孢菌烯醇(3-AcDON)。而在15-AcDON菌株中,则催化3,15-AcDON的C3位脱乙酰化而形成15-AcDON产物。在产生NIV毒素菌株中的作用与15-AcDON菌株相同<sup>[17]</sup>。

本研究通过设计引物扩增部分 *Tri8* 基因并用 *AvaI* 内切酶进行酶切,根据酶切片段大小的不同区分三种毒素化学型,为区分三种化学型菌株提供了一种新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 真菌基因组 DNA 的提取

从分离自江苏、安徽、河南和山东省的小麦赤霉病菌中随机挑选60株菌,将供试菌株接种到PDA平板上进行活化,25℃培养7 d,刮取菌丝至研钵中,用液氮冷冻并迅速研磨成粉状。真菌基因组DNA的提取采用DNA快速提取试剂盒(DS-BIN1151,广州东盛生物科技有限公司)。

### 1.2 种和化学型的鉴定

采用引物 EF1/EF2(表1)扩增 *tef-1α* 基因部分序列,PCR反应体系为:10×PCR buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2.5 μL, dNTP 2 μL, 5 mM 上游引物和下游引物各 1 μL, *Taq* DNA 合成酶 0.25 μL, DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 17.25 μL。PCR反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 1 min,58℃ 30 s,72℃ 1 min,共35个循环;72℃ 5 min。

扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测(120 v, 30 min),并用数码凝胶成像系统(Tanon, 1600R)观察拍照。利用回收试剂盒(AXYGEN)进行切胶回收并进行克隆转化后,交由金斯瑞生物科技公司进行测序。根据测得的 *tef-1α* 基因序列确定菌株所属的种<sup>[18]</sup>。

采用特异性引物 Tri13P1 和 Tri13P2(表1)对禾谷镰孢菌复合种 *Tri13* 基因部分序列进行特异性扩增,3-AcDON、15-AcDON 和 NIV 化学型菌株的扩增产物大小分别为644、583和859 bp<sup>[19, 20]</sup>。其PCR反应程序为:94℃ 4 min;94℃ 1 min,58℃ 40 s,72℃ 40 s,共35个循环;72℃ 5 min,扩增产物采用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 *Tri8* 基因的扩增和酶切

从已经鉴定出化学型的60株菌中随机选出30株(表2),每种化学型各10株。利用引物2036/2037、2038/2039和2040/2041(表1)分别扩增化学型15-AcDON、3-AcDON和NIV完整的 *Tri8* 基因,PCR反应体系为:10×PCR buffer(含

Table 1 PCR primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence(5'-3')	Reference
EF1	ATGGGTAAGGAAGACAAGAC	[18]
EF2	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	[18]
Tri13P1	CTCSACCGCATCGAAGASTCTC	[19, 20]
Tri13P2	GAASGTCGCARGACCTTGTTTC	[19, 20]
2036	CAGAAGCTTGTTCACTCACTCAGTATGGCTCTCG	[17]
2037	CAGGAATTCTGTCAAGAAAATGAAATTACCAGGCAG	[17]
2038	ACGAAGCTTATCCATCCATCCATTTAGTATGGTTCTCG	[17]
2039	CAGGAATTCGGCTCACATTTCTTATCACAACCTCTC	[17]
2040	CAGAAGCTTCATTCATCCACTCAGCATGGCTCTCGATC	[17]
2041	CAGGAATTCAGGTCAAGAGATGAATTACCAGGC	[17]
<i>Tri8</i> -1	GTCACGTCCTTGATAACACAACCT	This study
<i>Tri8</i> -2	ACCCGTGGTATACTGCACCTCCTGG	This study

Table 2 Area, species and chemotype information for the 30 *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) isolates

Isolates	Area	Species	Chemotype
F1201	Jiangsu	<i>Fusarium asiaticum</i>	3-AcDON
F1203	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1209	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1222	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1233	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1246	Anhui	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1252	Anhui	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1301	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1302	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1321	Anhui	<i>F. asiaticum</i>	3-AcDON
F1232	Anhui	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1249	Shandong	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1266	Henan	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1273	Shandong	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1279	Henan	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1315	Anhui	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1324	Shandong	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1330	Shandong	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1332	Shandong	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F1333	Shandong	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
F10112	Shandong	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1210	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1225	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1227	Anhui	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1237	Shandong	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1257	Anhui	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1259	Anhui	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1268	Anhui	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1303	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	NIV
F1304	Jiangsu	<i>F. asiaticum</i>	NIV

Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, dNTP 2 μL, 5 mM 上游引物和下游引物各 1 μL, *Taq* DNA 合成酶 0.25 μL, DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 17.25 μL。PCR 反应程序为: 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测 (120 v, 30 min)。利用回收试剂盒 (AXYGEN) 进行切胶回收后, 交由金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

测序获得的结果应用 BioEdit 软件对比分析, 根据三种化学型基因的保守序列, 利用软件 Primer Premier 5 设计引物 (*Tri8-1/Tri8-2*) (表 1) 扩增部分 *Tri8* 基因。PCR 反应程序为: 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。三种化学型的 *Tri8* 基因序列存在多个酶切位点, 用限制性内切酶 *Ava* I 对扩增的部分 *Tri8* 基因产物进行酶切, 根据酶切片段大小的不同可以较好区分三种化学型菌株。酶切反应体系: *Ava* I 酶 1 μL, 10×K buffer 2 μL, DNA 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。反应条件: 37℃ 温浴 1 h, 酶切产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测 (120 v, 30 min)。

#### 1.4 代表性菌株产毒检测

为了验证试验结果的可靠性, 我们选取了初步鉴定化学型的 60 株菌当中的其余 30 菌株, 一方面利用 *Tri8* 基因进行检测, 另一方面进行了产毒化学型鉴定。我们借鉴并改进了液体培养基产毒素方法<sup>[21, 22]</sup>。将活化好的 30 株赤霉病菌菌丝接种到 6% 的绿豆汤中, 2 d 后获得分生孢子并调试孢子浓度到 1~2×10<sup>5</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 从中取出 1 mL 的分生孢子液接种到 50 mL GYEP 培养基中 (盛放于 250 mL 锥形瓶中), 黑暗条件下 25℃ 摇床 (180 r·min<sup>-1</sup>) 上震荡培养 3 d, 将产生的菌丝分散均匀, 然后将全部的培养物转移到 50 mL 的离心管中进行离心 (6 000 r·min<sup>-1</sup>), 将离心得到的上清液吸除一半, 剩余的上清液和菌丝混合均匀。从中取出 1.5 mL 浓缩液加入 20 mL MYRO 的培养基中 (盛放于 100 mL 锥形瓶中), 25℃ 黑暗条件下静置培养 14 d 后全部转移到 50 mL 离心管中, 8 000 rpm 离心 5 min, 从中取出 5 mL, 用 5 mL 的乙酸乙酯进行萃取, 吸取上清液 3 mL 至 15 mL 的离心管中, 然后用 50℃ 的氮流缓慢吹干后加入 0.5 mL 的甲醇水 (甲醇: 水=20: 80), 随后把 0.5 mL 流动相

全部通过 0.22 μm 有机系微孔滤膜, 最后收集的滤液用液相色谱-质谱仪 (VARIAN, Pro Star, USA) 进行分析<sup>[23]</sup>。色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 2.1×150 mm 3.5 μm, 柱温: 40℃, 流动相: A 甲醇 (5 mM 乙酸铵); B 水 (5 mM 乙酸铵), 流速: 200 μL·min<sup>-1</sup>, 进样量: 5.0 μL。离子源: ESI 负模式, 扫描方式: MRM, 毛细管电压: -4 500 V, 干燥气: 30 psi, 温度: 350℃, 雾化气: 60 psi, 辅助气: 65 psi, 检测方式: 多重反应监测 (MRM)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *F. graminearum* 和 *F. asiaticum* 种及毒素化学型的区分

利用引物 EF1/EF2 扩增部分 *tef-1α* 基因, 长度大约 700 bp。在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对, 与这些序列相似度最高的为 *F. graminearum* 或 *F. asiaticum* 菌株 *tef-1α* 部分序列。进一步采用序列比对软件 BioEdit 对测序的 *tef-1α* 部分基因进行序列比对, 发现 *F. graminearum* 和 *F. asiaticum* 共有四处碱基差异。在 60 株赤霉菌株中, 有 40 株是 *F. asiaticum* 种, 20 株属于 *F. graminearum* 种。根据对 *Tri13* 基因特异性扩增<sup>[20]</sup> 的结果, 其中 40 株 *F. asiaticum* 种中有 20 株是 3-AcDON 化学型, 20 株是 NIV 化学型。20 株 *F. graminearum* 种全部是 15-AcDON 化学型。

### 2.2 利用 *Tri8* 基因区分三种化学型

利用引物 2036/2037、2038/2039、2040/2041 (表 1) 扩增三种化学型完整的 *Tri8* 基因, 测序后通过比较三种化学型 *Tri8* 基因的保守序列设计特异性引物 *Tri8-1/Tri8-2*, 该对引物可以同时扩增三种化学型菌株的部分 *Tri8* 基因, 片段大小约为 1 055 bp (图 1), 通过比较 *Tri8* 基因测序结果发现, 三种化学型的基因序列存在多个酶切位点, 包括内切酶 *Bg* II、*Eco*R II、*Eco*R V、*Hinf* I、*Taq* I 和 *Ava* I (*BmeT110I*), 内切酶 *Ava* I 和 *Taq* I 在三种化学型菌株间酶切位点所在位置不同, 对这两个酶酶切效果进行了比较, 结果显示内切酶 *Taq* I 酶切片段太多, 琼脂糖凝胶电泳条带杂乱。内切酶 *Ava* I 在三种化学型中的酶切位点少, 酶切片段大小差异显著, 可以较好的把三个化学型菌株区分开。琼脂糖凝胶电泳显示, NIV 化学型菌株条带大小仍然是

1 055 bp左右,化学型 15-AcDON 菌株被酶切成两个片段,分别是 918 和 137 bp 左右,化学型 3-AcDON 菌株被酶切的片段大小大约是 515 和 540 bp (图 2)。利用该方法鉴定的结果与初步鉴定的菌株化学型一致。

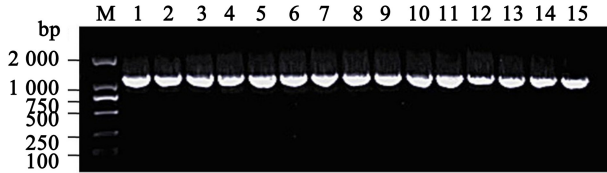


Fig. 1 PCR amplification of partial fragments of *Tri8* gene

1-5: 15-AcDON, 6-10: 3-AcDON,  
11-15: NIV, M: 2000 bp DNA marker.

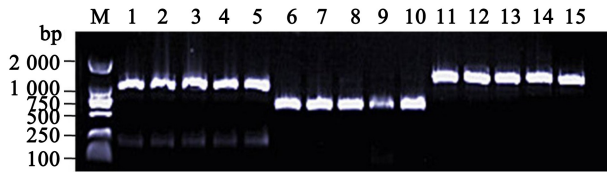


Fig. 2 Enzyme digestion assays to identify the chemotypes of *Fusarium graminearum* species complex isolates

PCR amplification of 15-AcDON(918 bp, 137 bp)、3-AcDON (515 bp, 540 bp)、NIV(1 055 bp)、M:2 000 bp DNA marker,  
1-5: 15-AcDON (F1232, F1249, F1266, F1273, F1279);  
6-10: 3-AcDON (F1201, F1203, F1209, F1222, F1233);  
11-15: NIV (F10112, F1210, F1225, F1227, F1237).

### 2.3 产毒素化学型的检测

利用液相色谱-质谱仪检测菌株的产毒情况,结果显示,三种化学型菌株均可以产生 DON 毒素。鉴定化学型为 3-AcDON 的 10 株菌株产 3-AcDON 毒素含量都比 15-AcDON 毒素含量高,鉴定化学型为 15-AcDON 的 10 株菌株产 15-AcDON 毒素含量都比 3-AcDON 毒素含量高,10 株 NIV 化学型菌株均没有检测出 3-AcDON 和 15-AcDON 毒素,由于菌株普遍产 NIV 毒素含量低,所以只有一株检测到了 NIV 毒素。该方法鉴定出的 3-AcDON 和 15-AcDON 化学型与利用分子方法区分化学型的结果一致(表 3)。

## 3 讨论

已有的研究表明利用 *tef-1 $\alpha$*  基因可以区分镰孢菌的多个种<sup>[18, 24]</sup>。本研究随机选择 60 株禾谷镰孢菌,通过比较 *tef-1 $\alpha$*  基因序列差异,确定有 40 株菌是 *F. asiaticum* 种,20 株菌属于 *F. graminearum* 种。通过扩增 *Tri13* 基因部分序列,初步鉴定每种化学型有 20 株菌。

Lee 等<sup>[25]</sup>发现 NIV 和 DON 型菌株在 *Tri7* 基因序列上差异较大,并设计了引物 GzTri7f1/f2 区分两种菌株毒素类型。Chandler 等<sup>[26]</sup>通过克隆 *Tri13* 基因序列,发现 DON 型菌株要比 NIV 型菌株缺失多个片段,并设计引物 Tri13F/R 区分两种毒素类型,根据 *Tri7* 基因设计了引物 Tri7F/R,该对引物能够在化学型 NIV 菌株中扩增出 436 bp 大小的产物,而在 DON 型菌株中扩增出 535 bp 大小的产物。Suga 等<sup>[27]</sup>根据 *Tri3* 和 *Tri12* 序列设计两对引物,根据产物大小可以鉴别出三种毒素化学型。Li 等<sup>[28]</sup>通过比较 *Tri5* 基因和 *Tri6* 基因之间的保守序列设计了特异性引物 TOXP,用来鉴定 DON 化学型菌株和 NIV 化学型菌株。*Tri8* 基因是控制三种毒素化学型形成的关键产毒基因<sup>[17]</sup>,因此本研究选用 *Tri8* 基因,根据其基因的序列差异区分三种化学型。PCR 检测结果显示三种化学型酶切条带大小差异大,可以明显地区分出三种化学型菌株。

目前检测毒素的方法主要有生物测定法、化学和免疫化学测定法。化学测定法是目前检测毒素使用最多的方法,色谱-质谱连用检测技术不仅具备气相色谱或液相色谱的检测灵敏度高等优点,而且可以定性、定量进行检测。不同菌株产生的毒素种类和数量差异都很大,而培养基的组成等条件对毒素的产生都有一定的影响,禾谷镰孢菌在固体培养基和液体培养基中均可产生毒素,但在固体培养基中主要产生 DON 毒素<sup>[29]</sup>,基于以上因素,作者使用液体培养基产毒并利用色谱-质谱仪检测毒素含量,检测结果为化学型 3-AcDON 的菌株产生的 3-AcDON 毒素含量最高,化学型为 15-AcDON 的菌株产生的 15-AcDON 毒素含量最高,化学型为 NIV 的菌株没有检测到 3-AcDON 毒素和 15-AcDON 毒素。

Table 3 HPLC-MS analysis mycotoxin production in *Fusarium graminearum* species complex isolates

Isolates	Area	Chemotype <sup>a</sup>	Trichothecene concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$			
			DON	3-AcDON	15-AcDON	NIV
F1221	Jiangsu	3-AcDON	0.96	4.75	0.66	<0
F1226	Anhui	3-AcDON	1.31	12.17	1.8	<0
F1305	Jiangsu	3-AcDON	0.43	0.75	<0	<0
F1310	Anhui	3-AcDON	1.18	7.57	1.15	<0
F1312	Anhui	3-AcDON	1.65	13.55	2.04	<0
F1314	Anhui	3-AcDON	0.59	3.28	0.43	<0
F1317	Anhui	3-AcDON	0.58	1.41	0.15	<0
F1318	Anhui	3-AcDON	0.98	5.24	0.81	<0
F1320	Anhui	3-AcDON	1.43	8.56	1.31	<0
F1336	Jiangsu	3-AcDON	1.22	8.56	1.22	<0
F1230	Anhui	15-AcDON	7.51	9.24	39.61	<0
F1243	Henan	15-AcDON	0.59	0.2	0.88	<0
F1281	Henan	15-AcDON	2.48	5.1	23.38	<0
F1289	Shandong	15-AcDON	0.42	<0	<0	<0
F1294	Shandong	15-AcDON	0.46	0.07	0.28	<0
F1298	Henan	15-AcDON	0.42	0.04	0.14	<0
F1307	Jiangsu	15-AcDON	0.52	0.4	1.83	<0
F1325	Shandong	15-AcDON	0.65	0.3	1.07	<0
F1327	Shandong	15-AcDON	2.11	2.25	10.56	<0
F1334	Henan	15-AcDON	1.59	1.82	9.8	<0
F1038	Jiangsu	NIV	0.38	<0	<0	<0
F1095	Jiangsu	NIV	0.39	<0	<0	<0
F1096	Jiangsu	NIV	0.38	<0	<0	<0
F10159	Jiangsu	NIV	0.38	<0	<0	<0
F1207	Jiangsu	NIV	0.38	<0	<0	<0
F1208	Jiangsu	NIV	0.38	<0	<0	<0
F1218	Jiangsu	NIV	0.38	<0	<0	<0
F1258	Anhui	NIV	0.38	<0	<0	<0
F1285	Henan	NIV	0.38	<0	<0	<0
F1286	Henan	NIV	0.38	<0	<0	0.19

a: The chemotypes of isolates were identified using the molecular methods. (*Tri13* and *Tri8* genes)

从利用引物 *Tri13P1* 和 *Tri13P2* 区分三种化学型和利用色谱-质谱方法测定毒素化学型的结果来看,利用内切酶 *Ava I* 酶切 *Tri8* 基因并通过酶切产物片段大小的方法可以准确有效地区分我国小麦赤霉病主要致病菌的化学型。

## 参考文献

- [1] Dubin H J, Gilchrist L, Reeves L, *et al.* *Fusarium* head blight: global status and prospects [J]. Mexico City :CIMMYT, 1997.
- [2] Goswami R S, Kistler H C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops [J]. Molecular Plant Pathology, 2004, 5(6): 515-525.
- [3] Kang W R, Hwang D J, Bae S C, *et al.* Evaluation of *Fusarium* head blight in barley infected by *Fusarium graminearum* [J]. Journal of Microbiology, 2013, 51

(4): 540-543.

- [4] Parry D W, Nieholson P, Mcleod L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review [J]. Plant Pathology, 1995, 44(2): 207-238.
- [5] Yang L, van der Lee T, Yang X, *et al.* *Fusarium* populations on Chinese barley show a dramatic gradient in mycotoxin profiles [J]. Phytopathology, 2008, 98(6): 719-727.
- [6] Qu B, Li H P, Zhang J B, *et al.* Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China [J]. Plant Pathology, 2008, 57(1): 15-24.
- [7] Starkey D E, Ward T J, Aoki T, *et al.* Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity [J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(11): 1191-1204.
- [8] Zhang H. Population genetic diversity and ecological adaptation of *Fusarium graminearum* species complex

- from wheat and barley in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (北京:中国农业科学院), 2011.
- [9] Ward T J, Clear R M, Rooney A P, *et al.* An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45 (4): 473-484.
- [10] Li H P, Wu A B, Zhao C S, *et al.* Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243(2): 505-511.
- [11] Suzuki F, Koba A, Nakajima T. Simultaneous identification of species and trichothecene chemotypes of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum sensu stricto* by multiplex PCR [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2010, 76(1): 31-36.
- [12] Jennings P, Coates M E, Turner J A, *et al.* Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay [J]. *Plant Pathology*, 2004, 53 (2): 182-190.
- [13] Jennings P, Coates M E, Walsh K, *et al.* Determination of deoxynivalenol - and nivalenol - producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales [J]. *Plant Pathology*, 2004, 53(5): 643-652.
- [14] Alexander N J, Proctor R H, McCormick S P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium* [J]. *Toxin Reviews*, 2009, 28 (2-3): 198-215.
- [15] Gale L R, Bryant J D, Calvo S, *et al.* Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations [J]. *Genetics*, 2005, 171 (3): 985-1001.
- [16] Merhej J, Richard-Forget F, Barreau C. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3): 519-528.
- [17] Alexander N J, McCormick S P, Waalwijk C, *et al.* The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(5): 485-495.
- [18] Kristensen R, Mona TORP, Kosiak B, *et al.* Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences [J]. *Mycological Research*, 2005, 109(2): 173-186.
- [19] Amarasinghe C, Wang J H, Liao Y C, *et al.* Difference in *TRI3* gene sequences between the 3-acetyldeoxynivalenol producing *Fusarium graminearum* chemotypes from Canada and China [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12 (9): 6164-6175.
- [20] Wang J H, Li H P, Qu B, *et al.* Development of a generic PCR detection of 3-acetyldeoxynivalenol-, 15-acetyldeoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum* clade [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9: 2495-2504.
- [21] McCormick S P, Alexander N J, Harris L J. CLM1 of *Fusarium graminearum* encodes a longiborneol synthase required for culmorin production [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(1): 136-141.
- [22] Miller J D, Blackwell B A. Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol and other metabolites by *Fusarium culmorum* HLX 1503 in a stirred jar fermentor [J]. *Canadian Journal of Botany*, 2011, 64(1): 1-5.
- [23] Chen H G, Cai Z X, Chen F, *et al.* The types of resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in the heads of different wheat germplasms (in Chinese) [J]. *Acta Phytophylacica Sinica (植物保护学报)*, 2007, 34(1): 32-36.
- [24] Park J M, Kim G Y, Lee S J, *et al.* Comparison of RAPD, AFLP, and *EF-1 $\alpha$*  sequences for the phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* and its formae speciales in Korea [J]. *Mycobiology*, 2006, 34(2): 45-55.
- [25] Lee T, Oh D W, Kim H S, *et al.* Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 2966-2972.
- [26] Chandler E A, Duncan R S, Thomsett M A, *et al.* Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis* [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 62(6): 355-367.
- [27] Suga H, Karugia G W, Ward T, *et al.* Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan [J]. *Phytopathology*, 2008, 98(2): 159-166.
- [28] Li H P, Wu A B, Zhao C S, *et al.* Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243(2): 505-511.
- [29] Puri K D, Zhong S B. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat [J]. *Phytopathology*, 2010, 100(10): 1007-1014.